

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 安倍 良和

題 目 Ionic Liquid Mediated Activation of Enzymatic Reactions
(イオン液体を用いた酵素反応活性化)

学位論文の概要及び要旨

酵素は究極の環境調和型触媒であり、今日では医薬や機能材料の中間体合成に酵素反応が広く利用されるようになった。しかし、有機合成の現場で使いやすくデザインした非天然基質を酵素で化学変換しようとするとも既存酵素が利用できないことも多い。このような場合、スクリーニングや遺伝子工学で新規酵素を開発する手法が一般的であった。一方、私はイオン液体を酵素タンパクの活性化剤や反応溶媒に用いて酵素反応の活性化を行った。

酵素タンパクに影響を与える化合物で酵素を被覆するという方法論による酵素活性化が知られている。たとえば、岡畑らは脂質修飾酵素が有機溶媒中で安定化して活性を示すことを報告している。私はイオン液体で酵素をコーティングすることで酵素を活性化できないか検討を行い、アルキルポリエチレン鎖を持つイミダゾリウム塩(IL1)でリパーゼをコーティングすると、顕著な活性化効果が得られることを見いだした。

市販のリパーゼPSには酵素タンパクの精製時の安定化のためにグリシンが20wt%添加されている。グリシンの安定化効果の起源は明らかでないが、イオン液体コーティングで酵素が活性化できることから、アミノ酸コーティングでもリパーゼの活性に変化が起きるのではないかと考えた。そこで、アミノ酸のみ、さらにイオン液体IL1との組み合わせでリパーゼタンパクのコーティングを行った。その結果アミノ酸のみのコーティングで最も良い結果が得られたのはチロシン、次いでバリンであったが、その活性化はさほどでもなく、IL1とアミノ酸を組み合わせでコーティングした場合に、顕著な活性化効果が得られた。この場合、プロリンとIL1との組み合わせが最も活性化効果が高くなり、プロリンとIL1の協調作用で大きな活性化効果が得られていることがわかった。

プロリンにはキラリティが存在する。そこで、キラリティによる活性化効果を調べるため、イミダゾリウムカチオンにプロリン由来のキララなピロリジン環を導入した。天然体のL-プロリ

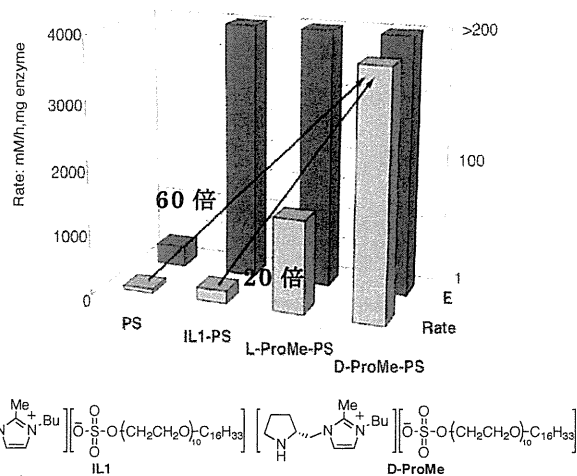


図 1. キララなアミノ酸由来官能基をもつアルキル PEG イオン液体コーティングによるリパーゼ活性化

ンと非天然体のD-プロリンからそれぞれイミダゾリウム塩 (L-ProMe, D-ProMe) を合成し, リパーゼタンパクをコーティングしたところ, キラルなピロリジン環を導入したイミダゾリウム塩はいずれのエナンチオマーもIL1を超える活性化効果を示した (図1). しかも, 天然体のL-プロリンより非天然体のD-プロリン由来のイミダゾリウム塩の方が活性化効果が高いことがわかり, 最も活性が高かったD-ProMe-PSではIL1と比べると約20倍, 市販のリパーゼPSと比べると約60倍の反応加速効果を示した.

次に, イオン液体を酵素反応の反応溶媒としてイオン液体コーティング酵素を利用することにした. 私たちの研究室では, イオン液体中でリパーゼを使用すると, イオン液体という溶媒にいわば酵素を固定化して酵素のリサイクル使用が可能となることを明らかにしている. 従って, イオン液体コーティング酵素がイオン液体溶媒で利用できると, 反応活性化と酵素のリサイクルができることになると期待した. ところが, 予備的実験の結果, イオン液体コーティング酵素はイオン液体溶媒の種類でその反応性が大きく変化することがわかり, 広く使用されているイオン液体[bmim][NTf₂]では, 反応速度, エナンチオ選択性ともに不十分であり, 既存のジイソプロピルエーテル溶媒より劣っていた. 私たちの研究室では, 側鎖にアルキルエーテル基を持つイオン液体が酵素反応に適しているという例を以前に見いだしている. そこで, 側鎖にメトキシエチル基を持つホスホニウム塩イオン液体[P_{444ME}][NTf₂]をデザインし, このイオン液体を反応溶媒に用いたところ優れた結果を示すことがわかった. 基質に4-フェニル-3-ブテン-2-オール(**1b**), アシル化剤に酢酸ビニルを用いると, ジイソプロピルエーテル溶媒を超える反応速度が得られた. また, このホスホニウム塩イオン液体[P_{444ME}][NTf₂]を溶媒に使用することで, 活性を保ったまま10回の酵素のリサイクルにも成功した.

そこで, アルキルエーテル基に着目し, リパーゼ触媒不斉アシル化反応に適したイオン液体のデザインを検討した. エーテル基を二つ持つメトキシエトキシメチル基を側鎖に導入したホスホニウム塩イオン液体[P_{444MEM}][NTf₂]をデザインし, このイオン液体を反応溶媒に用いてリパーゼ触媒不斉アシル化反応を行なった (Table 1). その結果, 1-フェニルエタノール(**1a**)を基質に, イオン液体コーティング酵素IL1-PSを用いた場合, [P_{444ME}][NTf₂]と比べると1.5倍, ジイソプロピルエーテルと比べると1.8倍の反応加速が起きた. ただし, 反応基質によって反応性が異なり, 4-フェニル-3-ブテン-2-オール(**1b**)では[P_{444ME}][NTf₂], [P_{444MEM}][NTf₂]ともに同様の反応性が得られ, 3-ヒドロキシペンタンニトリル(**1c**)では[P_{444MEM}][NTf₂]中の反応が約1.6倍速いが, エナンチオ選択性は低下した. また, 5-フェニル-1-ペンテン-3-オール(**1d**)では反応性は同様であり, ジイソプロピルエーテルに比べると4.8倍の反応加速が観察された.

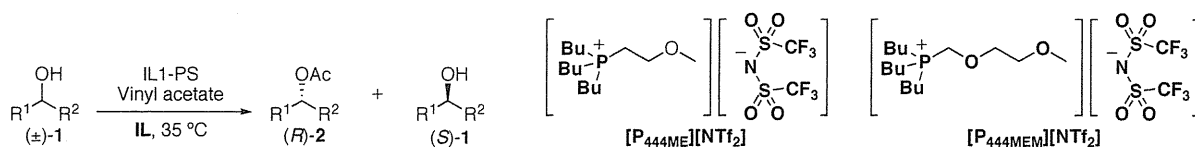


Table 1. IL1-PS catalysed asymmetric transesterification in ionic liquid solvents

Substrate	1a		1b		1c		1d	
	[P _{444ME}][NTf ₂]	[P _{444MEM}][NTf ₂]	[P _{444ME}][NTf ₂]	[P _{444MEM}][NTf ₂]	[P _{444ME}][NTf ₂]	[P _{444MEM}][NTf ₂]	[P _{444ME}][NTf ₂]	[P _{444MEM}][NTf ₂]
Rate ^a	4200	6200	1000	850	4300	6700	250	290
E value	>200	>200	>200	>200	15	10	137	>200

^a mM / h, mg enzyme